



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 G01N 33/15, 33/50	A1	(11) 国際公開番号 WO00/33069 (43) 国際公開日 2000年6月8日(08.06.00)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06615</p> <p>(22) 国際出願日 1999年11月26日(26.11.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/353926 1998年11月27日(27.11.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 小林製薬株式会社 (KOBAYASHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒541-8507 大阪府大阪市中央区道修町4-3-6 Osaka, (JP) 長岡 均(NAGAOKA, Hitoshi)[JP/JP] 〒270-1152 千葉県我孫子市寿2丁目22番13号 Chiba, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 浅野健治(ASANO, Kenji)[JP/JP] 松田由紀子(MATSUDA, Yukiko)[JP/JP] 〒532-0035 大阪府大阪市淀川区三津屋南3-13-35 小林製薬株式会社内 Osaka, (JP) 田島 裕(TAJIMA, Yutaka)[JP/JP] 〒849-0935 佐賀県佐賀市八戸溝3丁目10番511号 Saga, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, CN, GB, KR, SG, US</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: SUBSTANCE CONTAINING SHIITAKE MUSHROOM HYPHA EXTRACT FOR SCREENING LAK ACTIVITY AND METHOD FOR SCREENING LAK ACTIVITY BY USING THE SAME</p> <p>(54) 発明の名称 シイタケ菌糸体抽出物を含有するLAK活性スクリーニング物質およびそれを用いたLAK活性スクリーニング法</p> <p>(57) Abstract An inexpensively available substance for screening an immunotherapeutic agent having antitumor and/or anticancer activities. A screening method for determining <i>in vitro</i> a substance having a LAK activity potentiating effect suitable for a subject which involves the following steps: (a) collecting the peripheral blood of the subject and preparing a lymphocyte fraction therefrom; (b) preparing a LAK-induction sample by adding the above screening substance to the lymphocyte fraction and a control sample containing no screening substance; and (c) measuring the LAK activities of the induction sample and the control sample and comparing the activities to thereby determine the LAK activity potentiating effect of the screening substance <i>in vitro</i> on the subject.</p>		

(57)要約

本発明は、安価に入手可能な抗腫瘍および／または抗癌活性を有する免疫療法剤をスクリーニングするための物質およびその方法を提供することを目的とする。

本発明は、以下の工程：

- (a) 被検体の末梢血を採取して、これからリンパ球画分を調製すること；
 - (b) 前記リンパ球画分に本発明のスクリーニング物質を添加した LAK 誘導サンプルと、スクリーニング物質を添加しない対照サンプルを調製すること；
 - (c) 前記誘導サンプルと前記対照サンプルについて、LAK 活性を測定してそれらの結果を相互に比較することにより当該被検体に対するスクリーニング物質の in vitro での LAK 活性増強作用を決定すること；
- を含む、被検体に適した LAK 活性増強作用を有する物質を in vitro で決定するスクリーニング方法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TH	タイ
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TJ	タジキスタン
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TZ	タンザニア
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	TR	トルコ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	IL	イスラエル	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IN	インド	NL	オランダ	US	米国
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	JP	日本	PL	ポーランド	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KE	ケニア	PT	ポルトガル	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KP	北朝鮮				
DE	ドイツ	KR	韓国				
DK	デンマーク						

明細書

シイタケ菌糸体抽出物を含有する LAK 活性スクリーニング物質
およびそれを用いた LAK 活性スクリーニング法5 技術分野

本発明は、腫瘍免疫学の分野に関する。特定すれば、本発明は、抗腫瘍および／または抗癌活性を有する免疫療法剤をスクリーニングするための物質およびその方法に関する。さらに特定すれば、本発明は、in vitro において in vivo における LAK 細胞（Lymphokine Activated Killer Cell：リンホカイン活性化キラー細胞）の活性増強効果が得られるかどうかを判断するためのスクリーニング物質およびその方法に関する。

背景技術

腫瘍免疫学における基本的概念として、腫瘍細胞が腫瘍抗原を有することが知られている。腫瘍細胞が有する腫瘍抗原には、正常細胞には発現せず腫瘍細胞にのみ存在する腫瘍特異抗原（TSA：Tumor Specific Antigen）、または正常細胞にもごく微量存在するが細胞の癌化に伴いその発現が増強される腫瘍関連抗原（TAA：Tumor Associated Antigen）が存在する。このような腫瘍抗原は、正常細胞の癌化に伴い生じる遺伝子変異に伴って新たに発現されるか、または当該変異に伴って発現調節が変化することにより発現される。異常な抗原性を有する腫瘍細胞の治療法としては、免疫療法がもっとも一般的であり、その例としては、被検体を腫瘍抗原で免疫したり、被検体の免疫機能を増強する薬剤が用いられる。一般に、腫瘍細胞を破壊する活性は、免疫系細胞の中でも NK（ナチュラルキラー）細胞で高く、また NK 細胞の活性も免疫療法により増強されることが知られている。

NK 細胞は、正常個体中に存在する非 T 非 B 細胞障害性リンパ系細胞であり、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞等に対して MHC 抗原に拘束されずに、MHC クラス I 分子を発現しないかまたは発現が低下した細胞に対する障害活性を示すことが知られている。しかしながら現在では、NK 細胞でも殺傷し得ない腫瘍細胞の存在も明らかとなった。

米国国立ガン研究所 (NCI: National Cancer Institute) の S. Rosenberg は、末梢リンパ球をインターロイキン 2 (IL-2) と共に培養すると、自家ガンを含む広い範囲の標的ガン細胞に対して細胞障害性を示す細胞を誘導することができ、この細胞によれば NK 細胞では殺傷不可能なガン細胞をも殺傷することができることを発見した (特開昭 62-116518 号参照)。このキラー細胞はリンホカイン活性化キラー細胞 (LAK 細胞: Lymphokine Activated Killer Cell) と命名された。LAK 細胞は、細胞学上は均一な集団ではなく、NK 細胞系やキラーT 細胞系の細胞集団であることが知られている。近年は、被検体由来の末梢リンパ球を細胞培養系中で IL-2 を用いて活性化した後、抗腫瘍活性を示す LAK 細胞を再び被検体体内に移入する、養子免疫の方法が試みられている (LAK 療法)。このような LAK 細胞の繰り返し投与による養子免疫により、末期癌の縮小あるいは増殖抑制例が報告されている。しかしながら、LAK 療法の効果は個体差があり、ほとんど効果を享受できない場合もある。また、被検体から多量の白血球を分離することが被検体に肉体的負担を負わせること、そして分離した白血球細胞を大量培養する必要がある経済的な負担が大きいことなど、種々の問題点がある。さらに、IL-2 を直接投与することによって LAK 療法を行う場合、高濃度の IL-2 投与による重篤な副作用が生じる。

具体的には、IL-2 を用いた LAK 養子免疫療法を行う場合、全身倦怠、悪寒、発熱、低アルブミン、貧血、好酸球増加などの症状を副作用として生じ、これらの副作用は IL-2 を単独で用いた場合よりも強いことが知られている。さらに注目すべきは、重大ないくつかの副作用の発現について、LAK 細胞が正常細胞に対して傷害活性を有している可能性が原因として考えられている。このような LAK 細胞による造血幹細胞傷害により、貧血や血小板減少が生じるほか、リンパ球、マクロファージや血管内皮細胞に対する *in vitro* 傷害も生じることも報告されている。また、IL-2 は経口投与による吸収が悪く、現在のところ、直接投与に際しては注射投与が主流である。

したがって、効果が明らかでない状態で副作用を生じる可能性のある LAK 療法を行うのではなく、直接投与によって LAK 活性を増強させ得るかどうかについてあらかじめ *in vitro* 系においてスクリーニングすることが望まれていた。しかし

ながら、IL-2 を用いて *in vitro* で行うスクリーニングでは、費用がかかりすぎるといふ欠点がある。

従来から、細菌類あるいは食品等が抗癌作用を有することが知られている。これらの抗癌作用を有する細菌類あるいは食品等は副作用が少なく安全であることから、これらの細菌類あるいは食品等からの抗癌作用物質の探索が試みられてきた。これまでに細菌類により癌を制圧しようとする多くの試みが行われており、例えばセラチア菌と溶連菌の培養濾液を用いた Coley's トキシン (1964)、BCG による白血病治療 (Mathe, G., *Adv. Cancer Res.*, 14, 1, 1971) およびモルモットにおける癌腫瘍の退縮 (Zbar, B., et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 48, 831, 1971)、および酵母壁多糖体の投与によるサルコーマ 180 等の移植癌に対する有効性等が報告されている。

特に、多糖体に関しては、酵母グルカン、酵母マンナン、その他の菌体の多糖体、地衣類および担子菌類の多糖体における抗癌効果について多くの研究が行われてきた。これらのうちで抗癌免疫増強薬として現在市販されているものとしては、担子菌類のサルノコシカケ科のカワラタケ培養菌糸体由来のクレスチン (吳羽化学、三共製薬：宿主の免疫機能賦活剤) およびシイタケ多糖体のレンチナン並びにスエヒロタケ多糖体などがある。

また、シイタケ (*Lentinus edodes*) は日本並びに中国を代表する食用キノコであって日本では約 300 年も前から人工栽培が行われてきたが、その薬理効果並びに薬効成分が最近解明されつつあり、例えば、ラット・マウスにおける大腸および肝臓等の移植腫瘍細胞の増殖抑制効果 (Sugano, N, et al., *Cancer Letter*, 27: 1, 1985 ; 鈴木康将ら、日本大腸肛門病会誌、43: 178, 1990) およびマイトジェン効果 (Tabata, T. et al., *Immunopharmacology*, 24: 57, 1992 ; Hibino, et al., *Immunopharmacology*, 28: 77, 1994) などが報告されている。

本発明者らは、シイタケの持つ LAK 活性増強効果 (抗腫瘍および／または抗癌活性) に着目し、シイタケ菌糸体抽出物を直接生体内に投与した際の *in vivo* での LAK 活性増強効果を、*in vitro* でスクリーニングするための、スクリーニング物質およびその方法を提供することを課題とする。

従来の方法では、実際に生体内に LAK 活性増強物質を投与することにより、あ

るいは生体内のリンパ球を大量に調製し、それを *in vitro* にて LAK 活性増強物質により活性化し、その後実際に生体内に活性化したリンパ球を戻すことにより、LAK 活性増強効果があるかどうかを確認していた。この方法では治療に費用がかかりすぎるという欠点の他に、被検体の肉体的負担が課題となるという欠点が存在していた。したがって、LAK 活性増強物質が実際に生体内で効果を有するかどうかについて *in vitro* で簡便にスクリーニングすることができれば、被検体の肉体的、金銭的負担を大きく軽減することができる。

発明の開示

10 本発明者らは、シイタケの生活環において食用形態である子実体の前の形態である菌糸から抽出された成分中に、子実体をはるかに凌ぐ免疫賦活活性並びに抗腫瘍活性および／または抗癌活性があることを見いだした。しかも当該抽出物を IL-2 の代替物として *in vitro* における LAK 活性誘導物質として使用することにより、当該抽出物を直接生体内に投与した際の *in vivo* における抗腫瘍作用および／または抗癌作用、特に LAK 活性増強作用を、*in vitro* においてスクリーニングできることを見いだして、本発明を完成するに至った。

より具体的には、本発明者らは、シイタケ菌糸体抽出物を含む抗腫瘍物質もしくは抗癌物質、特に LAK 活性増強物質を直接生体内に投与する場合の *in vivo* における細胞傷害活性が、被検体から調製したリンパ球を *in vitro* において前記の
20 LAK 活性増強物質により活性化する場合の細胞傷害活性と正の相関を有することを見出した。本発明は、以下の工程：

- (a) 被検体の末梢血を採取して、これからリンパ球画分を調製すること；
 - (b) 前記リンパ球画分に本発明のスクリーニング物質を添加した LAK 誘導サンプルと、スクリーニング物質を添加しない対照サンプルを調製すること；
 - 25 (c) 前記誘導サンプルと前記対照サンプルについて、LAK 活性を測定してそれらの結果を相互に比較することにより当該被検体に対するスクリーニング物質の *in vitro* での LAK 活性増強作用を決定すること；
- を含む、被検体に適した LAK 活性増強作用を有する物質を *in vitro* で決定する方法を提供する。本発明はまた、前述の *in vitro* におけるスクリーニング方法に使

用することにより、in vivo において LAK 活性を増強し得るかどうかをスクリーニングし得る、シイタケ菌糸体抽出物を含有するスクリーニング物質を提供する。したがって、本発明は LAK 活性増強物質により in vivo での LAK 活性増強効果を期待できるか否かについて、LAK 活性増強物質の投与前に in vitro において判断

5 することができる、シイタケの菌糸体抽出物を含有するスクリーニング物質およびそのスクリーニング方法に関する。本発明のスクリーニング物質およびスクリーニング方法は、ヒトのみならず家畜にも使用可能である。

本明細書において、「LAK 活性」とは、NK 活性を担うリンパ球では認識できない腫瘍を攻撃でき、かつ自己の正常細胞にはほとんど影響を与えない細胞障害性 T

10 リンパ球の示す抗腫瘍活性のことを意味する。「LAK 活性増強」とはこうした LAK 活性を強めることであり、リンパ球から LAK 細胞を誘導するあるいは既に存在する LAK 細胞の抗腫瘍活性をさらに高めることを意味する。

LAK 活性を増強することで、LAK 細胞の抗腫瘍活性を高めることができるが、これは細胞性免疫系の向上を導く。したがって、抗腫瘍活性の向上を期待す

15 る治療以外にも、免疫系の向上を目的とする治療に用いることができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明のシイタケ菌糸体抽出物を用いた LAK 活性増強スクリーニングの結果を示す表 1 のデータを、棒グラフにより示したものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、シイタケ菌糸体抽出物を含む抗腫瘍剤もしくは抗癌剤、特に LAK 活性を増強するための製剤を、直接生体内に投与することにより LAK 活性の増強効果を期待できるか否かについて、製剤投与前に in vitro において判断することが

25 できる、シイタケの菌糸体抽出物を含有するスクリーニング物質およびそのスクリーニング方法を提供する。本発明において、「スクリーニング物質」とは、それを生体に投与した場合の in vivo での LAK 活性の増強効果を、in vitro にて調べるために使用する物質のことをいう。本発明において、スクリーニング物質として用いられる「シイタケ菌体抽出物」とは、シイタケ菌を固体培地上で培養した

際に得られる菌糸体もしくは菌糸体を含む固体培地を、水および酵素の存在下で粉砕、分解して得られる抽出物を言う。

シイタケ菌糸体抽出物は、好ましくは以下の方法により得られたものを使用するが、これに限定されない。即ち、バガス（サトウキビのしぼりかす）と脱脂米糠を基材とする固体培地上にシイタケ菌を接種し、菌糸体を増殖させた後、菌糸体が増殖した固体培地を 12 メッシュ通過分が 30 重量%以下となるように解束する。この解束された固体培地に水を加え、さらに炭水化物分解酵素、またはタンパク質分解酵素、もしくはこれらの組合せからなる酵素（群）を添加して、30-35℃の温度に保つことにより、前記固体培地を粉砕、搗潰する。この工程で使用する酵素としては、セルラーゼ、プロテアーゼ、グルコシダーゼなどが含まれるが、これらには限定されない。前記工程で粉砕、搗潰した固体培地を、バガス繊維の少なくとも 70 重量%以上が 12 メッシュ通過分であるように調製して、次に 95℃までの温度に加熱することにより酵素を失活させ、同時に滅菌する。最後に得られた懸濁状液体を濾過することによりシイタケ菌糸体抽出物を得る。

シイタケ菌糸体抽出物はそのまま本発明のスクリーニング物質あるいは免疫療法剤として用いてもよいが、これを濃縮、凍結乾燥して粉末として保存して、使用時に種々の形態で使用するのが便利である。凍結乾燥して得られる粉末は褐色粉末であり、吸湿性があり、特異な味と匂いを有する。

本発明のシイタケ菌糸体抽出物は、末梢血から得られるリンパ球画分に対して直接添加することができる。リンパ球画分に対して直接添加する場合における本発明のスクリーニング物質中に含まれるシイタケ菌糸体抽出物の濃度は、好ましくは 1 ng/ml~100 mg/ml であり、さらに好ましくは 1 μg/ml~100 μg/ml であり、特に好ましくは 10 μg/ml~50 μg/ml である。本発明のシイタケ菌糸体抽出物は、培養細胞に添加する前にまたは末梢血に対して直接添加する前に、アセトンによる無菌処理を行うことが好ましい。

本発明のスクリーニング物質を用いてスクリーニングを行う方法としては、高木らの方法に従うが（臨床免疫、19: 245-249, 1987）、IL-2 に代えて、スクリーニング物質、例えば本発明のシイタケ菌糸体抽出物を用いる点で従来の方法と相違する。

即ち、本発明の LAK 活性増強スクリーニング法は、以下の工程：

(a) 被検体の末梢血を採取して、これからリンパ球画分を調製すること；

(b) 前記リンパ球画分に本発明のスクリーニング物質を添加した LAK 誘導サンプルと、スクリーニング物質を添加しない対照サンプルを調製すること；

5 (c) 前記誘導サンプルと前記対照サンプルについて、LAK 活性を測定してそれらの結果を相互に比較することにより当該被検体に対するスクリーニング物質の *in vitro* での LAK 活性増強作用を決定すること；

を含む、被検体に適した LAK 活性増強作用を有する物質を *in vitro* で決定する方法である。

10 LAK 細胞を誘導するために、被験者の末梢血からリンパ球を分離する。被験者から採血した末梢血にヘパリンを加え、Ficoll-Conary 液 (s. g. = 1.077) を用いた比重遠心分離法により界面の単核球を分離する。分離された単核球を PBS (pH7.4、Ca および Mg を含まず) により 2~3 回洗浄したのち、 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ になるように培養液 (好ましくは、RPMI 1640 培地 (Gibco) に、FBS (非働化血清) や抗生物質などを適宜加えたもの) に懸濁する。これを、自己血清 (血漿) を 37℃
15 15 分処理してコートしたペトリ皿に移し、37℃1 時間培養する。非付着性細胞を回収して、リンパ球分画とする。

LAK 誘導サンプルは、例えば以下の方法により調製する。すなわち、上述の方法により得られたリンパ球画分を、細胞の最終濃度が $1 \times 10^5 / \text{ml} \sim 1 \times 10^6 / \text{ml}$ と
20 なるように調製し、培養液中に浮遊させ、1 ウェルあたり細胞を懸濁した培養液 $100 \mu\text{l}$ を添加することにより、細胞数が $1 \times 10^4 / \text{ウェル} \sim 1 \times 10^5 / \text{ウェル}$ となるようにする。1 ウェル当たりの細胞数は、当業者が、使用するエフェクター細胞の活性、標的細胞のエフェクター細胞に対する感受性などにより適宜定めることができる。該浮遊液には、実験計画に従って、スクリーニング物質として最終濃度
25 $1 \text{ ng/ml} \sim 100 \text{ mg/ml}$ の範囲のシイタケ菌糸体抽出物を加える。

このようにして、被検体のリンパ球を種々の濃度 (濃度ゼロを含む) の本発明のシイタケ菌糸体抽出物の存在下で培養しエフェクター細胞とする。本明細書においては、エフェクター細胞とは、3 日間上記の培養処理を行った細胞を指し、LAK 活性増強物質と共に培養されたリンパ球 (LAK 活性増強物質添加処理されたり

ンパ球)および LAK 活性増強物質を含まない培養液のみで培養されたリンパ球(無添加誘導処理されたリンパ球)の両方を含む。

対照サンプルは、スクリーニング物質を添加する代わりに滅菌した組換え IL-2 (rIL-2 ; 2000 U/ml) を添加する以外は、LAK 誘導サンプルを調製する方法と同一の方法により調整する。

LAK 活性の測定は、 ^{51}Cr 放出アッセイ法、 ^3H ウリジン法などの方法により行う。本発明においては、簡便性および客観性の観点から、 ^{51}Cr 放出アッセイを使用することが好ましい。 ^{51}Cr 放出アッセイは、LAK 活性増強物質で処理されたリンパ球から誘導された LAK 細胞による標的細胞傷害活性を *in vitro* において測定する方法の一つである。 ^{51}Cr 放出アッセイは、以下の工程：

(i) 標的細胞に ^{51}Cr で標識したクロム酸ナトリウムを添加することにより標的細胞を標識すること；

(ii) 前記標的細胞を、スクリーニング物質あるいは対照としての rIL-2 により刺激したエフェクター細胞（例えば、キラーT 細胞や LAK 細胞）と反応させること；

(iii) 標的細胞がエフェクター細胞により破壊される場合に細胞培養上清中に放出される ^{51}Cr の量を測定すること；

からなる、エフェクター細胞による標的細胞に対する細胞傷害活性を測定する方法である。

^{51}Cr 放出アッセイにおいて使用する標的細胞である継代培養細胞としては、好ましくは Daudi 細胞あるいは Raji 細胞を使用する。標的細胞の培養は、培養フラスコ中で培養したものを回収し、 ^{51}Cr で標識した後マイクロタイタープレートに分注して行う。標的細胞の培養液としては、使用する細胞が増殖するために適したものを使用し、例えば RPMI 1640 などの培養液に血清、抗生物質などを適宜追加したものを使用する。

標的細胞の標識は、培養した標的細胞 10^6 個あたりに $100\sim 150\mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr -クロム酸ナトリウムを添加し、よく攪拌した後 37°C で $1\sim 2$ 時間インキュベートすることにより行う。培養細胞は、PBS により 3 回洗浄した後、 1×10^6 /ml になるように 10%FBS 添加 RPMI 1640 培地に懸濁したものを使用する。標識した後、培

養時に用いた培養液またはリン酸緩衝液（PBS）を用いて洗浄し、最後に 10% のウシ胎児血清（FBS）または仔ウシ血清（FCS）を含む培養液中で最終濃度 1×10^6 /ml となるように調製し、アッセイに使用する。標的細胞は、マイクロタイタープレート（MP）の各ウェル中に、細胞数が 5×10^4 /ml となるように、 $50 \mu\text{l}$ ずつ分注する。

細胞傷害活性を測定するためのアッセイにおいては、上述の標的細胞を分注した各ウェルに、最大解離用には 1N-HCl を $100 \mu\text{l}$ をさらに添加し、自然解離用には培養液のみ $100 \mu\text{l}$ をさらに添加し、そして実験解離用には種々の濃度の本発明のシイタケ菌糸体抽出物または対照である 2000 U/ml の rIL-2 により刺激したエフェクター細胞 1×10^5 /ml \sim 1×10^6 /ml を含有する培養液 $100 \mu\text{l}$ をさらに添加する。次いで、マイクロタイタープレートをプレート遠心分離機により、800 rpm で 5 分間遠心処理して細胞をウェル底部に集めた後、5% CO₂ 培養器にて 37℃ において 3.5 時間培養する。

⁵¹Cr 放出アッセイにおける標的細胞傷害活性は、以下の式：

$$\text{LAK 活性 \%} = \frac{\text{実験解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}}{\text{最大解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}} \times 100$$

によって、算出する。この式により算出した LAK 活性について、誘導サンプルと対照サンプルの値を互いに比較することにより、スクリーニング物質による in vitro での LAK 活性誘導能を測定することができる。

上述の最大解離、自然解離および実験解離を求める工程において、標的細胞の培養は、5% CO₂ にて 37℃ において行い、培養時間は、実験目的、使用する細胞の数、その他の条件に従って、当業者が適宜決定することができるが、本発明においては 3.5 時間培養する。

培養上清中に放出された ⁵¹Cr による放射線量は、シンチレーションカウンターなどを使用することにより測定することができる。

本発明の好ましい態様において、各工程は以下のとおりに実施するが、適切な変更および修飾がなされてよいことは、当業者には認識される。

培養したプレートから各ウェルの培養上清を採取し、シンチレーションカウンタにより放射活性を測定する。

上述のスクリーニング方法により *in vitro* における LAK 誘導活性が認められたシイタケ菌糸体抽出物を、3600mg/日で 7 日間、生体に投与して *in vitro* で LAK 5 活性を誘導した。上述のリンパ球回収方法により採取したリンパ球画分を使用して、上述の LAK 誘導サンプルの時と同様の条件下で LAK 活性%を測定したところ、*in vivo* での LAK 活性増強作用は *in vitro* において得られた結果と、正の相関を示すことがわかった。

本発明を以下の実施例によりさらに詳細に説明するが、これらはあくまで例示 10 であって、本発明の範囲を限定するためのものではない。本発明の精神から逸脱することなく、本発明に対する様々な変更あるいは修飾がなされてよいことは、当業者には理解される。

実施例

15 実施例 1：シイタケ菌糸体抽出物の調製

バガス 90 重量部、米糠 10 重量部からなる固体培地に純水を適度に含ませた後に、シイタケ種菌を接種し、温度および湿度を調節した培養室内に放置し、菌糸体を増殖させた。菌糸体が固体培地に密集した後、バガス基材の繊維素を解束し、12 メッシュ通過分が 24 重量%以下となるようにした。この解束された培地 1.0 kg 20 に、純水 3.5 L および精製セルラーゼ 2.0 g を、固体培地を 40℃ に保ちながら加えて培地含有混合物とした。

次いで、培地含有混合物を変速ギヤー付ポンプにより循環させながら、固体培地にギヤー部分において粉碎および擂潰作用を 200 分間程度加えて、バガス繊維の約 80 重量%が 12 メッシュ通過分となるようにした。培地含有混合物の粉碎および擂潰は、該混合物の温度を徐々に上昇させながら実施した。その後、培地含有混合物をさらに 90℃ まで加熱して酵素を失活せしめると同時に滅菌して、90℃ 25 に 30 分間放置した。得られた培地含有混合液を 60 メッシュ濾布により濾過してシイタケ菌糸体抽出物とし、濃縮した後、凍結乾燥粉末を得た。

このようにして得られるシイタケ菌糸体抽出物はフェノールー硫酸法による糖

質分析により糖質を 25.3% (重量/重量)、ローリー法によるタンパク質分析によりタンパク質を 19.7% (重量/重量)、没食子酸を規準とする Folon-Denis 法によりポリフェノールを 2.6% (重量/重量) 含んでいた。シイタケ菌糸体抽出物には、その他に粗脂肪 8%、粗灰分 22%、糖質以外の可溶性無窒素物を約 20% 含んでいた。このうち、シイタケ菌糸体抽出物中の構成糖組成は以下のとおりであった。Xyl: 15.2; Ara: 8.2; Man: 8.4; Gul: 39.4; Gal: 5.4; GlcN: 12.0; GLuUA: 11.3。

実施例 2 : LAK 活性の測定

- 10 まず、被検体 A、B および C から、シイタケ菌糸体抽出物服用前の末梢血、および各被検体にシイタケ菌糸体抽出物 1200 mg を毎日 3 回、1 週間にわたって経口投与した後の末梢血を、それぞれ採血した。これらの末梢血から下記の方法により分離されるリンパ球画分を使用して、本発明の抽出物が生体内でリンパ球を活性化する能力と、抽出物を用いてリンパ球を *in vitro* で活性化する能力との相関性についてスクリーニングすることができる。

- まず、採取されたこれらの末梢血にヘパリンを加え、Ficoll-Conary 液 (s. g. = 1.077) を用いた比重遠心分離法により界面の単核球を分離し、次いでこの分離された単核球を PBS (pH 7.4、Ca および Mg を不含) により 2 回洗浄したのち、 1×10^6 /ml になるように 10% FBS (非働化ウシ胎児血清) を培養液に添加した RPMI 1640 培地 (Gibco) に懸濁した。上述の方法により分離した細胞を、あらかじめ自己血清 (血漿) を用いて 37°C で 15 分間処理してコートした培養皿に移し、37°C で 1 時間培養した後に、非付着性の細胞をリンパ球画分として採取した。

- 10% FBS 添加 RPMI 1640 培養液中で培養した標的細胞である継代培養細胞 (Daudi 細胞) を遠心分離により回収し、 10^6 細胞当たり 100~150 μ Ci の ^{51}Cr -クロム酸ナトリウム (New England Nuclear) を添加し、5% CO_2 培養器にて 37°C において 1 時間培養した。 ^{51}Cr により標識された培養細胞を PBS により 3 回洗浄後、 1×10^6 /ml になるように 10% FBS 添加 RPMI 1640 培養液中に懸濁した。

マイクロタイタープレートの各ウェルに上述した方法で標識した標的細胞を 50 μ l (5×10^4 /ウェル) ずつ分注し、さらに、最大解離群 (陽性対照) には 1N-HCl

を 100 μ l ずつ分注し、自然解離群（陰性対照）には 10% FBS 添加 RPMI 1640 培養液を 100 μ l ずつ分注し、そして実験解離群には 10 μ g/ml の濃度の本発明のシイタケ菌糸体抽出物または対照としての 2000 U/ml の濃度の rIL-2 により刺激したエフェクター細胞（100 μ l（ 1×10^4 / ウェル）ずつ）を分注した。プレート遠心分離機により 800 rpm において 5 分間遠心処理して細胞をウェル底部に集めた後、5% CO₂ 培養器にて 37℃ において 3.5 時間培養した。

培養したプレートから SOKEN-PET Σ -96 にて各ウェルの培養上清を採取し、 γ -シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。

LAK 活性は以下の表に従って算出した。

$$\text{LAK 活性 \%} = \frac{\text{実験解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}}{\text{最大解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}} \times 100$$

結果を表 1 並びに図 1 に示す。

表 1:

実験番号	LAK 活性		
	被検体 A	被検体 B	被検体 C
1 服用前	13%	27%	14%
2 抽出物によるスクリーニング (最終濃度: 10 μ g/ml)	21%	34%	15%
3 抽出物服用後	40%	43%	15%

産業上の利用可能性

被検体 A および B において実際にシイタケ菌糸体抽出物を経口投与したところ、*in vivo* において LAK 活性が増強していることが確認された（表 1、実験 3 を参照）。これに対して本発明の抽出物を使用した *in vitro* でのスクリーニングでは、被検体 A および B の末梢血から採取したリンパ球を本発明の抽出物を用いて刺激した場合に、本発明の抽出物を被検体 A および B に直接経口投与した場合に得られる

LAK 活性の増強効果と正の相関を示す LAK 活性の増強効果が認められた（表 1、実験 2 を参照）。したがって、本発明のシイタケ菌糸体抽出物を経口投与した際の LAK 活性の増強効果を、in vitro のスクリーニングで予測することができることが判明した。

- 5 一方、被検体 C において実際にシイタケ菌糸体含有物を経口投与したところ、in vivo においても LAK 活性が増強していないことが確認された（表 1、実験 3 を参照）。これに対して本発明の抽出物を使用した in vitro でのスクリーニングでは、被検体 C の末梢血から採取したリンパ球を本発明の抽出物を用いて刺激しても、本発明の抽出物を直接経口投与した場合に得られる LAK 活性の増強効果が
10 認められなかった（表 1、実験 2 を参照）。したがって、この例からも、本発明のシイタケ菌糸体抽出物を経口投与した際の in vivo での LAK 活性増強効果を、in vitro でスクリーニングすることにより予測することができることが判明した。

- よって、本発明の LAK 活性増強物質を生体に経口投与した場合の in vitro での LAK 活性の増強効果を、in vitro においてスクリーニング結果からより正確に予
15 測することができることがわかった。これにより、本発明のシイタケ菌糸体抽出物を直接投与した際の in vivo での LAK 活性増強効果を、当該 LAK 活性増強物質を直接投与する前に、in vitro で簡便に判断することができ、LAK 活性増強効果の期待できる被検体に対して、LAK 活性増強物質の効果的な投与を迅速に行うことができるだけでなく、LAK 活性増強効果の期待できない被検体に対しては、LAK
20 活性増強物質の無駄な投与を防止することができる。

また、本発明の方法では、被検体の血液から大量のリンパ球を採取することなく、LAK 活性増強物質の in vivo における治療効果を in vitro でスクリーニングすることができるので、被検体の肉体的負担も著しく軽減される。

請求の範囲

1. 以下の工程：

(a) 被検体の末梢血を採取して、これからリンパ球画分を調製すること；

5 (b) 前記リンパ球画分に本発明のスクリーニング物質を添加した LAK 誘導サンプルと、スクリーニング物質を添加しない対照サンプルを調製すること；

(c) 前記誘導サンプルと前記対照サンプルについて、LAK 活性を測定してそれらの結果を相互に比較することにより当該被検体に対するスクリーニング物質の in vitro での LAK 活性増強作用を決定すること；

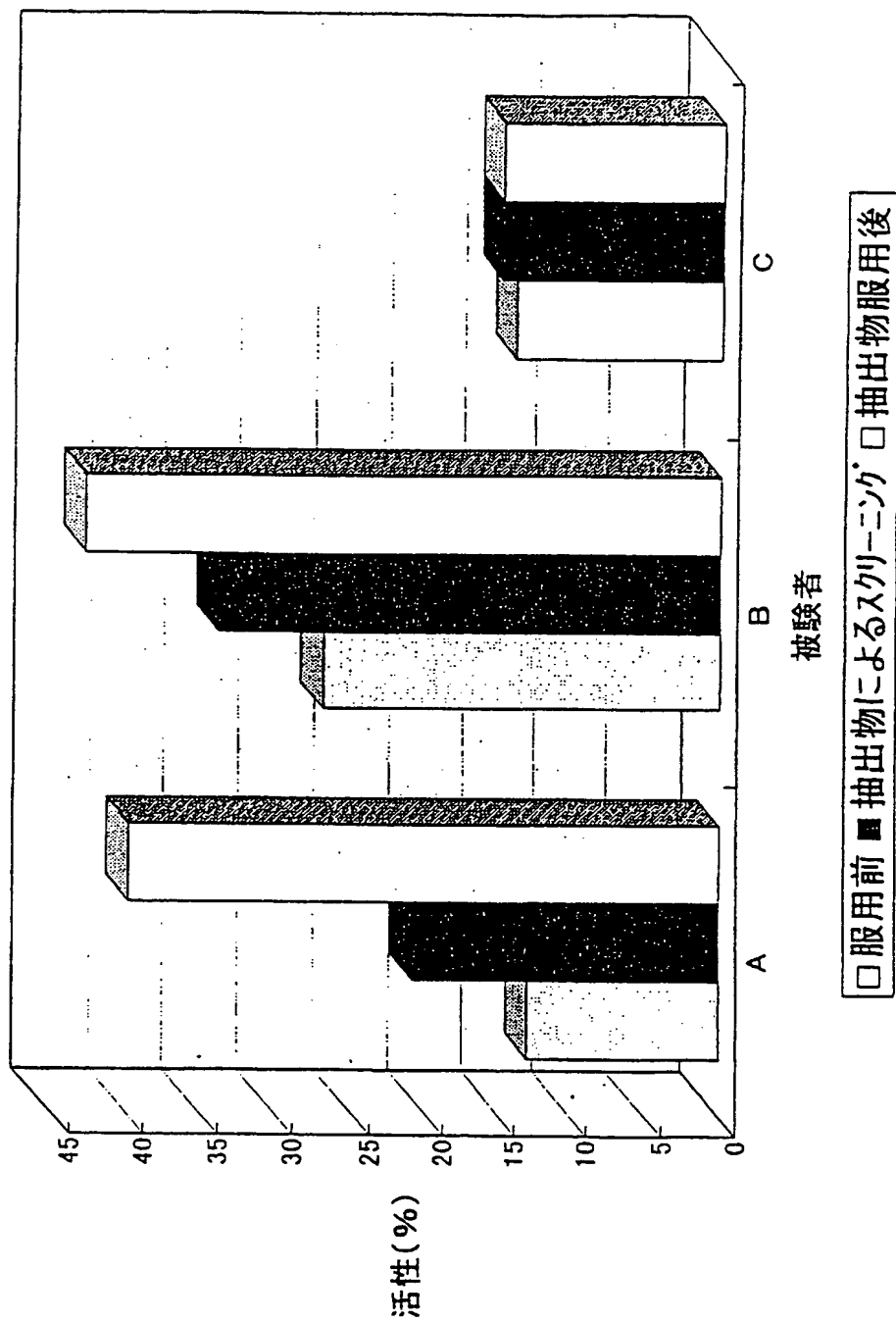
10 を含む、被検体に適した LAK 活性増強作用を有する物質を in vitro で決定する方法。

2. スクリーニング物質がシイタケ菌糸体抽出物である、請求項 1 に記載の方法。

15 3. 請求項 1 に記載の in vitro におけるスクリーニング方法に使用することにより、in vivo において LAK 活性を増強し得るかどうかをスクリーニングし得る、シイタケ菌糸体抽出物を含有するスクリーニング物質。

4. 請求項 2 に記載のスクリーニング物質を生体内に投与することによる、被検体の腫瘍を治療する方法。

図 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06615

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/15, 33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N33/15, 33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS
JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LAGADEC P.F., "HUMAN SMALL-CELL LUNG-CANCER CELLS ARE CYTOKINE-RESISTANT BUT NK-LAK-SENSITIVE", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, (1991), VOL. 48, NO. 2, P. 311-317	1-3
Y	K. Amino, "Hito rinpakyu ni taisuru renchinkan no menneki fukatsu sayo ni tsuite", Gan to Kagaku Ryoho, (1981), Vol. 8, No. 6, pages 967-973	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 February, 2000 (14.02.00)

Date of mailing of the international search report
22 February, 2000 (22.02.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06615

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 4
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The subject matter of claim 4 corresponds to a method for treatment by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ G 01 N 33/15, 33/50		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ G 01 N 33/15, 33/50		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>日本国実用新案公報</div> <div>1922-1996年</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>日本国公開実用新案公報</div> <div>1971-2000年</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>日本国登録実用新案公報</div> <div>1994-2000年</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>日本国実用新案登録公報</div> <div>1996-2000年</div> </div>		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS JOIS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	LAGADEC P. F., "HUMAN SMALL-CELL LUNG-CANCER CELLS ARE CYTOKIN E-RESISTANT BUT NK-LAK-SENSITIVE", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, (1991), VOL. 48, NO. 2, P. 311-317	1 ~ 3
Y	網野光人, "ヒトリンパ球に対するレンチナンの免疫賦活作用について", 癌と化学療法, (1981), 第8巻, 第6号, 967-973	1 ~ 3
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p> </div> </div>		
国際調査を完了した日 <div style="text-align: right;">14.02.00</div>		国際調査報告の発送日 <div style="text-align: right; font-size: 1.2em;">22.02.00</div>
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) <div style="text-align: center;"> 亀田 宏之 印 </div> 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 4 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
治療方法である。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。